Aus dem Chemisch-Physiologischen Institut
zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Professor Dr. Felix)

Über die Milchsäure-Bildung aus Glycerinsäure und phosphorylierten Glycerinsäure-Produkten in der Muskulatur und Niere.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT
ZU FRANKFURT AM MAIN

vorgelegt von

Arthur Stern
aus Frankfurt a. Main

im März 1936

Dissertationsdruckerei F. W. Kalbfleisch, Gelnhausen

Gedruckt mit der Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität zu Frankfurt a. M.

Referent : Professor Dr. H. Jost.

Dekan : Professor Dr. Gänßlen.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Über die Milchsäure-Bildung aus Glycerinsäure und phosphorylierten Glycerinsäure-Produkten in der Muskulatur und Niere.

Die von Embden und seinen Mitarbeitern gewonnenen neuen Vorstellungen über die intermediären Vorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur und Niere führten zur Erkenntnis, daß hierbei als normale, intermediäre Produkte aus einem Molekül Hexosediphosphorsäure zwei Moleküle Triosephosphorsäure entstehen. An diesen beiden Molekülen geht dann eine Umlagerung im Sinne der Cannizarro'schen vor sich, bei der Phosphoglycerinsäure und Glycerinphosphorsäure gebildet werden. Beide konnten auch in reichlicher Menge isoliert werden. Im weiteren Verlauf der Glykolyse wird dann die Phosphoglycerinsäure in Brenztraubensäure und Phosphorsäure gespalten, und die so gebildete Brenztraubensäure zu Milchsäure reduziert, unter gleichzeitiger Oxydation der Glycerinphosphorsäure zu Triosephosphorsäure. Im Gegensatz zur Phosphoglycerinsäure zerfällt also die Glycerinphosphorsäure nicht, sondern sie dient als Wasserstoff-Donator bei der Milchsäure-Bildung. So ist es auch verständlich, daß bei Versuchen mit gleichzeitigem Zusatz von Phosphoglycerinsäure und Glycerinphosphorsäure viel größere Mengen Milchsäure in der Muskulatur gebildet werden können, als beispielsweise bei alleinigem Zusatz von Phosphoglycerinsäure, da im letzteren Falle nicht genügend Wasserstoff-Donator zur Verfügung stand. (Embden und Deuticke 1) Durch die Arbeiten von Embden und seinen Mitarbeitern (2) ist der Zucker-Abbau bis zur Brenztraubensäure klargestellt worden, und es kann heute gar kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß die Phosphoglycerinsäure und die Glycerinphosphorsäure normale Abbau-Produkte bei der Glykolyse sind. Besonders betont werden soll hier, daß also die Dephosphorylierung erst im 3-Kohlenstoff-Stadium stattfindet. So konnten Embden und Deuticke (3) zeigen, daß die Glykolyse-Hemmung bei der Fluorid-Vergiftung der Muskulatur darin besteht, daß die Phosphoglycerinsäure wohl noch gebildet werden kann, daß aber gerade die Dephosphorylierung nicht mehr stattfinden kann.

Bereits in der ersten Veröffentlichung (4), besonders aber in der späteren Arbeit (1) wurde darauf hingewiesen, daß diese Dephosphorylierung keine hydrolytische ist, bei der also unter Wasseraufnahme freie Glycerinsäure neben Phosphorsäure entsteht, sondern, daß ohne Wasseraufnahme Brenztraubensäure gebildet wird. In den Arbeiten des Instituts ist wiederholt darauf hingewiesen worden, daß bei dieser Betrachtung das Methylglyoxal ausgeschaltet werden kann, da gerade nachgewiesen werden konnte, daß im Gegensatz zu den Anschauungen Neuberg's das Methylglyoxal nicht als Zwischenstufe bei der Bildung der normal vorkommenden Milchsäure in Frage kommt.

Schon einmal war in einer Arbeit von Jost (5) ein Phosphorsäure-Ester der Glycerinsäure, nämlich die Diphosphoglycerinsäure als normales Produkt bei der Glykolyse erkannt worden. Jost konnte nachweisen, daß bei der anäroben Glykolyse durch Blutkörperchen Diphosphoglycerinsäure entsteht.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nun, das Verhalten der freien, wie der einfach und doppelt mit Phosphorsäure veresterten Glycerinsäure in Hinsicht auf die Möglichkeit der Milchsäure-Bildung in Niere und Muskulatur zu prüfen. Nach den Feststellungen von Jost (5) verhält sich die Niere ja besonders in Bezug auf die Dephosphorylierung ganz anders, als die Muskulatur, und es stehen der Niere andere Wasserstoff-Donatoren und in reicherem Maße zur Verfügung, als der Muskulatur. Es sollte daher speziell an der Niere die Möglichkeit der Milchsäure-Bildung aus den genannten Substanzen untersucht werden.

Chemischer Teil:

Verwandt wurden bei den Zusatz-Versuchen folgende Substanzen:

freie Glycerinsäure
Phosphoglycerinsäure
Diphosphoglycerinsäure
Glycerinphosphorsäure.

Zur Darstellung der Phosphoglycerinsäure und der Glycerinphosphorsäure sei auf die Arbeit von Embden, Deuticke und Kraft (6), sowie auf die bereits zitierte Arbeit von Embden und Deuticke (1) hingewiesen, zu der Darstellung der Diphosphoglycerinsäure auf die genannte Arbeit von Jost (5). Für die vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit wurden die gleichen Darstellungs-Methoden angewandt.

Die freie Glycerinsäure mußte aus der käuflichen durch Reinigung und Umkristallisation gewonnen werden. Das geschah in folgender Weise über das sehr rein, kristallinisch darstellbare Blei-Salz:

100.0 ccm der käuflichen Glycerinsäure (Schering-Kahlbaum) werden auf dem Babo-Blech in einem Rundkolben mit etwa 200 ccm dest. Wasser zum Sieden erhitzt. Sofort nach dem Sieden Zufügen von Basischem Bleikarbonat, so lange, bis keine Kohlensäure mehr entweicht. Dazwischen mehrmaliges, kurzes Aufkochen. Kochend filtrieren, Filtrat mit Filter nochmals aufkochen, wieder sofort nach dem Aufkochen durch Heißwassertrichter filtrieren. Aus der rotbraunen, lackmussauer reagierenden, stark aromatisch riechenden Flüssigkeit kristallisiert in der Kälte, am besten im Eisschrank das Salz bald in reicher Menge aus. Nach 8—10-stündigem Stehen absaugen, Niederschlag in möglichst wenig sehr heißem Wasser aufnehmen, kurz aufsieden lassen unter Zufügen von Tierkohle bis zur völligen Entfärbung. Aus dem ganz farblosen Filtrat kristallisiert das weiße Salz bei Abkühlung wieder sehr bald und ausgiebig aus. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus sehr wenig heißem Wasser wird das schneeweiße Salz schließlich im Trockenschrank getrocknet. Man muß dabei sehr vorsichtig vorgehen, halbstündiges, wiederholtes Trocknen bei 105 Grad, nicht mehr, zwischendurch Trocknen im Schwefelsäure-Vakuum-Exsikkator, bis schließlich absolute Gewichts-Konstanz eingetreten ist. Die absolute Reinheit und Trockenheit des Salzes wird dann durch die nachfolgende Blei-Analyse bestätigt.

Zum Versuch wird die Säure aus dem Salz in folgender Weise freigemacht: Eine roh abgewogene Menge des trocknen Salzes (Blei-Analyse

vorausgegangen) wird in möglichst wenig siedendem Wasser aufgelöst, sofort Schwefelwasserstoff eingeleitet und unmittelbar anschließend in der bereit stehenden Vakuum-Destillation entlüftet und auf ein möglichst geringes Volumen eingeengt. Durch Titrieren gegen genau eingestellte Natronlauge wird dann der Prozentgehalt der Lösung an freier Glycerinsäure ermittelt, darauf wird eine genau abgemessene Menge der freien Säure mit Natronlauge so neutralisiert, daß blaues Lackmuspapier gerade nicht mehr gerötet wird. Dann wird die neutralisierte Lösung im Meßkolben auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. In dieser Form wurde dann die immer frisch aus dem Salz freigemachte und genau eingestellte Glycerinsäure als Natriumsalz den entsprechenden Ansätzen zugefügt. Natürlich wurden die verschiedenen Zusatzlösungen vorher so aufeinander eingestellt, daß sie äquimolekular waren.

Bei der Aufarbeitung der Versuche ergab sich dann die Frage, ob nicht die zugesetzte, freie Glycerinsäure selbst oder ihre eventuellen Umwandlungsprodukte bei der Milchsäure-Bestimmung eine wesentliche Fehlerquelle sein konnten. Anfänglich wurde deshalb vor jeder Milchsäure-Bestimmung am Lind'schen Apparat eine bis 60-stündige Aether-Extraktion der Schenckfiltrate vorgenommen, und die Milchsäure-Bestimmungen an der vom Aether befreiten Lösung ausgeführt. Dabei zeigte sich jeweils, daß der Umschlagspunkt bei der Jod-Titration nur sehr schwer zu bestimmen war, und daß die Ansätze mit zugesetzter Glycerinsäure einen bedeutend höheren Milchsäurewert ergaben. Daraufhin wurde an die Aether-Extraktion die übliche Kupfer-Kalk-Fällung angeschlossen. Die danach erhaltenen Werte zeigten für die Milchsäure eine nur geringe Erhöhung bei den Ansätzen mit zugesetzter Glycerinsäure, auch war der Umschlagspunkt scharf, wie sonst immer. Schließlich wurde in weiteren Kontroll-Versuchen eine Milchsäure-Bestimmung an Ansätzen ausgeführt, die keiner Aether-Extraktion unterworfen waren, sondern bei denen die Kupfer-Kalk-Fällung direkt am Schenck-Filtrat vorgenommen war. Da diese Reihe fast genau die gleichen Resultate ergab, wie die mit vorausgegangener Aether-Extraktion, konnte man annehmen, daß die störenden Stoffe durch die Kupfer-Kalk-Fällung ausgeschaltet werden, und in der Folgezeit wurde deshalb die Kupfer-Kalk-Fällung, wie üblich, direkt am Schenck-Filtrat gemacht. Dafür wurden bei allen Versuchen, bei denen freie Glycerinsäure zugesetzt wurde, Kontroll-Ansätze gemacht, bei denen einmal Glycerinsäure anstelle mit dem betreffenden Organ, mit Wasser exponiert wurde. Im Uebrigen wurden die Ansätze ganz gleich behandelt, sodaß damit der Leerwert der Glycerinsäure für die Milchsäure-Bildung jedesmal mitbestimmt wurde.

Biologischer Teil:

Für die Muskulatur-Versuche nahmen wir, wie meistens an unserem Institut, Kaninchen-Muskel, und für die Nieren-Versuche frische Rinder-Niere. Auf Versuche mit gleichzeitiger Verarbeitung von Muskulatur und Niere von einem großen Hund soll weiter unten besonders eingegangen werden. Die Verarbeitung der Muskulatur geschah in der gleichen Weise, wie es von Embden und Deticke (1) geschildert ist, die der Niere ebenso, wie es Jost (7) beschrieben hat. Auch in Bezug auf die Aufarbeitung der Versuche kann auf die genannten Arbeiten verwiesen werden.

Tabelle I zeigt das Ergebnis für die Versuche an Kaninchen-Muskulatur mit Zusatz von freier Glycerinsäure. Man ersieht daraus die Einwir-

kung lebensfrischer Muskulatur auf Glycerinsäure, Glycerinphosphorsäure und beide Substanzen gleichzeitig. Jeder Ansatz enthielt 25 g Muskulatur in 50 ccm Expositionsflüssigkeit. Exposition für 90 Minuten bei 40 Grad, dann Fällung mit je 25 ccm 8%iger Salzsäure und 5%iger Sublimatlösung.

TABELLE I:

Versuche an Kaninchen-Muskulatur.

Versuch 1. (Protokoll Nr. 8, vom 6. 10. 33)

Zugesetzte Substanzen:	im Gesamtvolumen ermittelte (in mg) anorgan. H_3PO_4:	Milchsäure:	Brenztraubensäure:
A_1 Statt Muskulatur H_2O, sofort gefällt. Glycerinsaures Na plus Glycerinphosphorsaures Na, wie bei B_4.	—	22.85	—
A_2 Muskulatur, ohne Zusatz, sofort gefällt.	117.7	70.84	0
B_1 Exposition für 90 Minuten bei 40 Grad, in 2.8%-iger Nabic. Lösung, ohne Zusatz.	152.3	88.94	0
B_2 Desgl., mit Zusatz von glycerinsaurem Na, enthaltend 371 mg Glycerinsäure.	151.4	104.06	0
B_3 Desgl., mit Zusatz von glycerinphosphorsaurem Na, enthaltend 343 mg anorganischer H_3PO_4.	185.0	92.46	0
B_4 Desgl., unter gleichzeit. Zusatz von glycerinsaurem Na, wie bei B_2, und glycerinphosphorsaurem Na, wie bei B_3.	183.7	118.12	0

Die Phosphorsäure-Abspaltung zeigt nichts Neues, erwähnt soll nur noch einmal sein, in wie geringem Maße Muskulatur aus der Glycerinphosphorsäure anorganische H_3PO_4 abzuspalten vermag, im Gegensatz zu dem gleich zu besprechenden Ergebnis bei Nierenversuchen. Auch bei B_4 ist die Phosphorsäure-Abspaltung sehr gering, sodaß sie sogar hinter der von B_3 alleine zurückblieb. Man hat also den Eindruck, daß die Glycerinsäure eher hemmend auf die Phosphorsäure-Abspaltung wirkt.

Bei der Milchsäure kann man nirgends von einer nennenswerten Mehrbildung sprechen. Im Leerversuch A_1 waren bereits 22.85 mg Milchsäure gebildet worden. Addiert man sie zu dem Wert von B_1 hinzu, so erhält man für B_4 den Wert 111.79, gegen 118.12 tatsächlich gebildete. Das entspricht einer effektiven Mehrbildung von 6.33 mg Milchsäure, bezw. 5.7%. Auch bei

gleichzeitigem Zusatz von Glycerinsäure und von Glycerinphosphorsäure findet also keine wesentliche Mehrbildung statt. Die Mehrbildung bei B_2 (Glycerinsäure alleine) blieb sogar hinter dem Wert zurück, den man erhält, wenn man statt Muskulatur Wasser zu Glycerinsäure zusetzte. Der in der Tabelle nicht angegebene Wert betrug im entsprechenden Leerversuch 18.81 mg.

Nach diesen Ergebnissen ist es nicht erstaunlich, daß in keinem der Ansätze Brenztraubensäure nachzuweisen war. Für die Muskulatur kommt also die freie Glycerinsäure nicht als Milchsäure-Bildner in Frage.

Nieren-Versuche:

Tabelle II zeigt das Ergebnis für die Versuche an Rinder-Niere:

Bei diesen Nieren-Versuchen wurde zugesetzt Glycerinsäure, Phosphoglycerinsäure, Diphosphoglycerinsäure und, als Wasserstoff-Donator immer Glycerinphosphorsäure. Man ersieht die angewandte Menge Nierenbrei, die Zeit der jeweiligen Exposition und sonstige Einzelheiten aus der Tabelle II. An die Exposition wurde in üblicher Weise die Schenckfällung angeschlossen.

Zu Tabelle II:

Verwandte Abkürzungen für die zugesetzten Substanzen:

Glycerinsaures Na	Gl
Glycerinphosphorsaures Na	GlPh
Phosphoglycerinsaures Na	PhGl
Disphosphoglycerinsäure Na	Diphos

Die angegebenen Mengen Milchsäure und Phosphorsäure sind mg im ganzen Ansatz. Brenztraubensäure war in allen Ansätzen negativ. Versuch 2 ist Protokoll Nr. 2 vom 27. 11. 33, Versuch 3 ist Protokoll Nr. 3 vom 3. 12. 33, Versuch 4 ist Protokoll Nr. 7 vom 30. 5. 34.

TABELLE II:
Versuche an Rinder-Niere.

	Versuch 2 Gl u. GlPh)	Versuch 3 (PhGl u. GlPh)	Versuch 4 (Diphos u. GlPh)
Expositionszeit in Min.	90	90	150
Verwandte Menge Nierenbrei in g	5	5	50
Anorganische H_3PO_4:			
A sofort gefällt	6.11	6.13	—
B_1 Exposition mit Na-bic	12.15	12.26	121.26
B_2 Expos. mit Gl	11.27	—	—
„ „ PhGl	—	27.66	—
„ „ Diphos	—	—	—
B_3 Expos. mit GlPh	29.24	29.41	248.58
B_4 Expos. mit beiden			
(Gl und GlPh)	31.14	—	—
(PhGl und GlPh)	—	36.78	—
(Diphos und GlPh)	—	—	593.59

(Fortsetzg. der Tabelle nächste Seite.)

	Versuch 2 Gl u. GlPh	Versuch 3 (PhGl u. GlPh)	Versuch 4 (Diphos u. GlPh)
Milchsäure:			
A sofort gefällt	10.65	10.86	79.99
Leerwert Gl, statt Nierenbrei Wasser	4.78	—	—
B_1 Expos. mit Na-bic.	12.87	13.04	—
B_2 Expos. mit Gl	15.96	—	—
„ „ PhGl	—	19.93	—
„ „ Diphos	—	—	—
B_3 Expos. mit GlPh	13.46	13.64	—
B_4 Expos. mit beiden			
(Gl und GlPh)	18.84	—	—
(PhGl und GlPh)	—	28.86	—
(Diphos und GlPh)	—	—	78.97
Brenztraubensäure:	Ueberall negativ.		

Die Milchsäure-Bildung verläuft also aus diesen Substanzen in der Niere weitgehend in ähnlicher Weise, wie in der Muskulatur. Auch hier bildet Phosphoglycerinsäure alleine bereits größere Mengen Milchsäure, während die Glycerinphosphorsäure alleine gar keine Mehrbildung verursacht. Setzt man aber beide Substanzen gleichzeitig zu, so findet in der Niere, wie in der Muskulatur eine sehr große Mehrbildung statt, die über das Doppelte der Menge beträgt, die durch die Substanzen alleine gebildet wurden.

Interessant ist nach dem vorhin über die Muskulatur Gesagten, daß die Dephosphorylierung der Glycerinphosphorsäure in der Niere im Gegensatz zur Muskulatur sogar leichter und in größerem Maße erfolgt, als die der Phosphoglycerinsäure. Erstaunlich ist hierbei, daß bei B_4 in dieser Reihe (Versuch 3) die Summe der Mehrbildungen von B_2 und B_3 gegenüber B_1 noch nicht einmal erreicht wird. Die Phosphoglycerinsäure wird zu 23%, die Glycerinphosphorsäure zu 25% gespalten, also in erheblich geringerem Maße, als die Phosphoglycerinsäure in der Muskulatur, die ja fast quantitativ dephosphoryliert wird. Die Menge der in B_4 abgespaltenen anorganischen Phosphorsäure ist etwa nur 75% der Summe der in B_2 und B_3 abgespaltenen. Gegenüber dem sehr ähnlichen Verhalten in Hinsicht auf die Milchsäure-Bildung nimmt der Unterschied in der Dephosphorylierung in der Niere im Vergleich zur Muskulatur in dem Ausmaß Wunder. Legt man in B_2 die Dephosphorylierung von 23% der zugesetzten organischen Phosphorsäure zu Grunde, so könnten aus ihnen theoretisch 14.26 mg Milchsäure gebildet werden, während aber nur 6.89 mg mehr, als in B_1, gefunden wurden, also 50% des theoretisch möglichen Wertes. In B_4 sind 18 mg mehr, als in B_1 gebildet worden, während, wie erwähnt, nur 75% der Summe der in B_2 und B_3 abgespaltenen Phosphorsäure gefunden wurden. Ginge die verminderte Abspaltung der Phosphorsäure in gleichem Maße auf beide Phosphorsäure-Ester zurück, so könnte die vermehrte Bildung von Milchsäure von 11.11 mg gegenüber B_2 garnicht erklärt werden. Es muß wohl angenommen werden, daß bei B_4 vorwiegend die Dephosphorylierung der Glycerinphosphorsäure

gehemmt war, und gleichzeitig muß diese Glycerinphosphorsäure hier in reicherem Maße als Wasserstoff-Donator zur Verfügung gestanden haben.

In diesem Zusammenhang überrascht es bedeutend weniger, daß nirgends Brenztraubensäure nachgewiesen wurde. Es wurde schon oben betont, daß nach Jost die Niere über große Mengen von Wasserstoff-Donatoren verfügt, und so kann angenommen werden, daß die im Verhältnis zur geringen Dephosphorylierung der Phosphoglycerinsäure große Milchsäure-Bildung zu einem Teil auch daraus zu erklären ist, daß die aufgetretene Brenztraubensäure in der Niere sofort zu Milchsäure reduziert werden kann.

Das Verhalten der Niere gegenüber zugesetzter Glycerinsäure zeigt die Reihe des Versuches 2 der Tabelle II.

Die Dephosphorylierung ist bei B_2 gegenüber B_1 gehemmt. Der Wert von B_3 entspricht ziemlich genau dem von B_3, im Versuch 3. B_4 zeigt hier eine um etwas größere Abspaltung, als B_3, sodaß man nicht von einer Hemmung, wie bei der Muskulatur, sprechen kann.

Die Milchsäure-Werte verhalten sich auch ähnlich, wie in der Muskulatur. B_2 zeigt eine Mehrbildung, die noch nicht der Summe vom Leerwert und B_1 entspricht. B_3 ist, wie in allen Versuchen, nur unwesentlich gegenüber B_1 erhöht. Und die vermehrte Bildung von B_4 macht noch nicht 14% der Summe der Mehrbildungen in B_2 und B_3 aus. Es kann also hier nicht von einer beachtlichen Mehrbildung von Milchsäure bei gleichzeitigem Zusatz von Glycerinsäure und Glycerinphosphorsäure die Rede sein. Es braucht in dem Zusammenhang kaum erwähnt zu werden, daß in keinem der Ansätze Brenztraubensäure nachgewiesen werden konnte.

Die dritte Spalte (Versuch 4 der Tabelle II) zeigt schließlich das Verhalten der Diphosphoglycerinsäure in Bezug auf Abspaltung von anorganischer Phosphorsäure und Milchsäure-Bildung.

Erwähnenswert ist hier die früher schon von Jost festgestellte gute Phosphorsäure-Abspaltung aus der Diphosphoglycerinsäure, während die gleiche Substanz überhaupt keine Mehrbildung von Milchsäure verursachte. Auch Brenztraubensäure war nirgends nachweisbar.

Versuche an Hunde-Muskulatur und Hunde-Niere:

Es interessierte uns schließlich noch, das Verhalten von Muskulatur und Niere an einem und demselben Tier zu untersuchen. Wir hatten bisher, wie erwähnt, an Kaninchen-Muskulatur und an Rinder-Niere die Versuche angestellt. Trotzdem wir bemüht waren, die Rinder-Niere so frisch, wie möglich zu verarbeiten, — die Zeit von der Schlachtung bis zur Verarbeitung der Niere überstieg dabei nicht eine halbe Stunde —, trotzdem war es natürlich bei einem so sauerstoffempfindlichen Organ denkbar, daß auch in der kurzen Zeit eine Schädigung der fermentativen Tätigkeit eintreten konnte. Außerdem schien es uns verlockend, das Verhalten der Organe eines Tieres zu untersuchen, da man nicht ohne weiteres die Muskulatur eines Tieres mit der Niere eines Tieres einer ganz anderen Art in Beziehung setzen konnte.

Wir gingen dabei in folgender Weise vor: Ein großer Schäferhund wird durch Erschießen getötet. Die schleunigst herausgenommenen Nieren

werden sofort auf eisgekühlter Platte zerkleinert, nachdem zuerst der Urin ausgedrückt worden und das Organ vom anhaftenden Fett und Bindegewebe befreit ist. Wie bei der Rinder-Niere werden auch hier Mark- und Rindensubstanz zusammen verwendet. Der durch die Zerkleinerung gewonnene Nierenbrei wird dann jeweils auf die verschiedenen Ansätze verteilt, in Mengen zu je 5 g. Gleichzeitig wird die Muskulatur des Rumpfes und der Extremitäten wie bei den entsprechenden Kaninchen-Versuchen zweimal durch eine eisgekühlte Fleischmaschine getrieben. Je 25 g des so gewonnenen Muskelbreies werden dann auf die entsprechenden, bereit stehenden Ansätze verteilt. Die weitere Aufarbeitung der Versuche war genau so, wie bei den übrigen Versuchen.

Zugesetzt wurden bei diesen Versuchen Phosphoglycerinsäure zur Muskulatur und Niere, zu letzterer außerdem noch Glycerinsäure alleine und zusammen mit Glycerinphosphorsäure. Für beide Organe wurde in einem A-Versuch mit sofortiger Fällung, ohne Exposition, die von vornherein vorhandene anorganische Phosphorsäure, sowie die Milchsäure ermittelt. Ebenso wurde der Leerwert der Glycerinsäure, wie bereits oben geschildert, dadurch ermittelt, daß Glycerinsäure einmal mit Wasser, anstatt mit Nierenbrei exponiert wurde. Die B-Ansätze kamen nach Verteilung der Muskulatur und der Niere auf die betreffenden Flaschen für 90 Minuten in ein Wasserbad von 40 Grad und wurden anschließend nach Schenck gefällt. Alle weiteren Einzelheiten sind aus der Tabelle III ersichtlich. Es gelten die gleichen Abkürzungen, wie S. 7 angeführt. Der Versuch ist Protokoll Nr. 5 vom 4. 1. 34. Die Zahlen sind mg im ganzen Ansatz.

TABELLE III:

Versuche an Hunde-Muskulatur und Hunde-Niere.

	Anorganische Phosphorsäure	Milchsäure	Brenztraubensäure
Niere:			
A sofort gefällt	5.31	8.23	—
C statt Niere Wasser, Zusatz von Gl, sonst wie B_2	—	5.41	—
B_1 ohne Zusatz, mit Na-bic. exponiert	14.21	9.84	0
B_2 desgl. mit Zusatz von Gl	14.43	14.17	0
B_3 desgl. mit Zusatz von PhGl	53.78	16.87	0
B_4 desgl. mit Zusatz von GlPh	61.35	12.20	0
B_5 desgl. mit Zusatz von Gl und GlPh	60.63	16.38	0
B_6 desgl. mit Zusatz von PhGl u. GlPh	72.58	17.72	0
Muskulatur:			
MA sofort gefällt	52.46	58.92	—
M_1 ohne Zusatz, mit Na-bic. exponiert	101.37	97.56	0
M_2 desgl. mit Zusatz von PhGl	272.67	187.79	214.01
M_3 desgl. mit Zusatz von GlPh	127.04	101.54	0
M_4 desgl. mit Zusatz von PhGl u. GlPh	382.44	292.68	61.38

(Abkürzungen siehe S. 7.)

Das Ergebnis, das in Tabelle III vorliegt, bringt in einiger Hinsicht eine Bestätigung des bisher Gesagten, aber andererseits neue Tatsachen.

Jost hat bereits darauf hingewiesen (7), daß Hunde-Niere besonders schlecht Milchsäure bildet. Die Bestätigung dafür bringt auch die vorliegende Versuchsreihe. Noch nicht einmal in B_6 vermag die Hunde-Niere nur so viel Milchsäure zu bilden, wie der Summe von B_1, ohne Zusatz, und dem Glycerinsäure-Leerwert entspricht. Im Vergleich hierzu erscheint dann die von der Rinder-Niere gebildete Menge Milchsäure noch als sehr hoch.

Eigenartig ist auch das Verhalten der Hunde-Muskulatur im Vergleich zu der von Kaninchen. Bei alleinigem Zusatz von Phosphoglycerinsäure wurde eine Mehrabspaltung von anorganischer Phosphorsäure um etwa 170% bewirkt, während der entsprechende Milchsäurewert nur eine Steigerung von etwa 100% aufweist. Zugleich treten große Mengen Brenztraubensäure auf, die zum Teil der verminderten Milchsäure entsprechen können, aber weit über diesen Wert hinausgehen. Bei gleichzeitigem Zusatz von Phosphoglycerinsäure und Glycerinphosphorsäure (M_4) zu Hunde-Muskulatur fällt die Brenztraubensäuremenge auf noch nicht 30% des Wertes in M_2, aber die Mehrbildung von Milchsäure bleibt in dem erwarteten Maße aus. Die Hunde-Muskulatur verhält sich also ganz anders, wie Kaninchen-Muskulatur, sowohl in Bezug auf die Dephosphorylierung, wie auf die Milchsäure-Bildung und erst recht auf die Bildung von Brenztraubensäure.

Aber besonders wichtig war uns der Nierenversuch: Auf die Milchsäure-Bildung wurde oben schon hingewiesen. Da, wie erwähnt, die Hunde-Niere noch nicht einmal aus den Substanzen, die für die Rinder-Niere, ebenso, wie für die Muskulatur gute Milchsäure-Bildner sind, Milchsäure zu bilden vermag, kann man nichts daraus schließen, daß sie auch nicht aus Glycerinsäure Milchsäure bildet.

In eigenartigem Widerspruch dazu steht das Verhalten der Hunde-Niere bei der Dephosphorylierung. Alle Werte sind hier ganz erstaunlich hoch. In B_3 ist der Wert bereits etwa 285% des Ausgangswertes in B_1, er wird aber auch an der Hunde-Niere noch weit überboten durch die Abspaltung in B_4, die 340% des Wertes von B_1 beträgt. Dagegen kann man aus Tabelle II ersehen, daß dort bei B_4 erst bei der Rinder-Niere 300% des Ausgangswertes des dortigen B_1 gebildet waren. In B_5 der Tabelle III zeigt der gemeinsame Zusatz von Glycerinsäure und Glycerinphosphorsäure eher eine Hemmung der Phosphorsäure-Abspaltung, also ähnlich, wie bei der Kaninchen-Muskulatur.

Es war denkbar, daß diese besondere Fähigkeit der Hunde-Niere zur Dephosphorylierung daher kam, weil sie frischer verarbeitet wurde, als Rinder-Niere, trotzdem diese, wie erwähnt, eine halbe Stunde nach der Schlachtung zum Ansatz kam. Daher ließen wir später in einem sonst ähnlichen Versuch, wie dem der Tabelle III, einen kleinen Teil der Hunde-Niere eisgekühlt zurück, um ihn dann eine Stunde später in ganz der gleichen Weise, wie im Hauptversuch einem Ansatz zuzufügen und zu verarbeiten. Dabei fanden wir, daß die Fähigkeit zur Dephosphorylierung in der Zeit nur um etwa 15% abgenommen hatte. Es mußte also ein Art-Unterschied sein, und keiner des Alters.

Man kann also aus diesen Hunde-Versuchen wohl schließen, daß sowohl die Muskulatur, als auch die Niere des Hundes sich anders verhält, als die gleichen Organe anderer Tiere, und zwar sowohl in Hinsicht auf die Milchsäure-Bildung, die Phosphorsäure-Abspaltung und die Brenztraubensäure-Bildung. Es kann daher aus den Versuchen dieser Reihe nichts Gültiges über die Fähigkeit der Milchsäure-Bildung aus den genannten Substanzen ausgesagt werden.

Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit:

Man kann das Ergebnis der vorliegenden Arbeit in folgender Weise zusammenfassen:

1.) Glycerinsäure kommt nicht als normales Abbauprodukt bei der Glykolyse in Betracht. Aus zugesetzter Glycerinsäure konnte weder Kaninchen-Muskulatur, noch Rinder-Niere Milchsäure in nennenswerten Mengen bilden.

2.) Es ist das eine Bestätigung dafür, daß, wie Embden und seine Mitarbeiter annahmen, und wie es die inzwischen veröffentlichten Instituts-Arbeiten gezeigt haben, die Phosphoglycerinsäure derart dephosphoryliert wird, daß aus ihr neben anorganischer Phosphorsäure Brenztraubensäure gebildet wird. Die Dephosphorylierung ist also, wie angenommen, keine hydrolytische.

3.) Phosphoglycerinsäure bildet auch in der Niere reichliche Mengen Milchsäure. Es ist damit weiter bestätigt, daß der Abbau in Niere und Muskulatur in gleicher Weise vor sich geht.

4.) Im Gegensatz zur Muskulatur spaltet die Rinder-Niere die Phosphoglycerinsäure nur zu etwa 23%, und sie dephosphoryliert die Glycerinphosphorsäure, die von der Muskulatur kaum angegriffen wird, sogar besser, als die Phosphoglycerinsäure, und zwar zu etwa 25%.

5.) Die bereits früher von Jost als normales Abbau-Produkt bei der anäroben Glykolyse durch rote Blutkörperchen nachgewiesene Diphosphoglycerinsäure kommt bei unseren Versuchen als Milchsäure-Bildner nicht in Betracht.

6.) Gleichzeitige Versuche an Hunde-Muskulatur und Hunde-Niere von einem Tier zeigten, daß sowohl die Muskulatur, wie die Niere vom Hunde sich anders verhalten, als die gleichen Organe anderer Tiere.

7.) Hunde-Muskulatur bildet zwar auch aus Phosphoglycerinsäure Milchsäure, und in vermehrtem Maße, wenn im gleichen Ansatz noch Glycerinphosphorsäure als Wasserstoff-Donator vorhanden ist. Aber die Gesamtmenge ist nicht entsprechend der, die durch Kaninchen-Muskulatur gebildet wird, und ebenso konnte gezeigt werden, daß die Phosphorsäure-Abspaltung anders verläuft, als in der Kaninchen-Muskulatur, und schließlich war auch das Verhalten in Hinsicht auf die Brenztraubensäure-Bildung anders.

8.) Hunde-Niere bildet, entsprechend früheren Mitteilungen Jost's sehr schlecht Milchsäure. Da sie aber noch nicht einmal in dem Versuch mit gleichzeitigem Zusatz von Phosphoglycerinsäure und Glycerinphosphorsäure Milchsäure zu bilden vermochte, kann man daraus, daß sie aus freier Glycerinsäure keine Milchsäure bildet, keinen Schluß auf den normalen Ablauf der Glykolyse ziehen.

9.) Bemerkenswert war im Gegensatz zu dem Mitgeteilten, daß die Hunde-Niere ausgezeichnet dephosphoryliert, und zwar noch viel besser, als die Rinder-Niere. Auch die Hunde-Niere spaltet Glycerinphosphorsäure wesentlich besser, als Phosphoglycerinsäure.

10.) Diese bessere Dephosphorylierung ist nicht damit zu erklären, daß die Hunde-Niere schneller zum Ansatz kam, als die Rinder-Niere. 1 Stunde gealterte, auf Eis aufbewahrte Hunde-Niere war in ihrem Dephosphorylierungsvermögen nur um etwa 15% schlechter, als die frische, und spaltete noch weit besser anorganische Phosphorsäure ab, als Rinder-Niere.

Die Arbeit wurde auf Anregung des verstorbenen Herrn Professor Embden ausgeführt. Für die bei der Durchführung der Arbeit geleistete Unterstützung möchte ich Herrn Prof. Jost noch danken.

Literatur-Verzeichnis:

1.) G. Embden und H. J. Deuticke: Ueber die Bedeutung der Phosphoglycerinsäure für die Glykolyse in der Muskulatur. Hoppe-Seyler, Bd. 230, 1934, S. 29.

2.) Gustav Embden's und seiner Mitarbeiter letzte Arbeiten. Hoppe-Seyler, Sonderdruck, Bd. 230, 1934, Heft 1 bis 6.

3.) G. Embden und H. J. Deuticke: Ueber die Einwirkung von Fluorid und Bromessigsäure auf die Intermediärvorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur. Hoppe-Seyler, Bd. 230, 1934, S. 50.

4.) G. Embden, H. J. Deuticke und G. Kraft: Ueber die intermediären Vorgänge bei der Glykolyse in der Muskulatur. Klinische Wochenschrift, 12. Jahrg., 1933, Nr. 6, S. 213.

5.) H. Jost: Ueber die Bedeutung des säurelöslichen, organischen Blutphosphors. Hoppe-Seyler, Bd. 165, 1927, S. 171.

6.) G. Embden, H. J. Deuticke und G. Kraft: Ueber das Vorkommen einer optisch aktiven Phosphoglycerinsäure bei der Glykolyse in der Muskulatur. Hoppe-Seyler, Bd. 230, 1934, S. 12.

7.) H. Jost: Ueber die anärobe Glykolyse in der Niere. Hoppe-Seyler, Bd. 230, 1934, S. 96.

LEBENSLAUF.

Ich bin 1904 zu Frankfurt a. Main geboren, 1922 Abitur am Goethe-Gymnasium zu Frankfurt a. Main, von 1922—1926 kaufmännisch tätig. Herbst 1926 Beginn des medizinischen Studiums, 1929 Physikum, 1932 Staatsexamen, beide zu Frankfurt a. Main. Bis Januar 1934 am Chemisch-Physiologischen Institut, Frankfurt a. Main, von da an als Assistent an der Klinik „La Moubra" in Montana-Vermala, Schweiz, am 12. 7. 1934 Approbation. Seit Februar 1936 am Hygienischen Institut der Universität Zürich.

Arthur Stern.